



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 9/51, C08F 22/14, 22/20	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/18455 (43) Date de publication internationale: 7 mai 1998 (07.05.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01907 (22) Date de dépôt international: 24 octobre 1997 (24.10.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/13039 25 octobre 1996 (25.10.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): VIRSOL [FR/FR]; 46, rue Boissière, F-75116 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BRU-MAGNIEZ, Nicole [FR/FR]; 24/26, avenue Raphaël, F-75016 Paris (FR). GUILLON, Xavier [FR/FR]; 30, rue d'Amour, F-47000 Agen (FR). BRETON, Pascal [FR/FR]; La Taille Haute, RD 13, F-45510 Tigry (FR). COUVREUR, Patrick [BE/FR]; 1 bis, rue du Lac Léman, F-91140 Villebon sur Yvette (FR). LESCURE, François [FR/FR]; 30, rue du Château, F-92500 Rueil Malmaison (FR). ROQUES-CARMES, Claude [FR/FR]; 3, chemin de la Barre aux Chevaux, F-25000 Besançon (FR). RIESS, Gérard [FR/FR]; 31, rue du Meunier, F-68200 Mulhouse (FR).		(74) Mandataires: HUBERT, Philippe etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR). (81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
(54) Title: METHOD FOR PREPARING MALONATE METHYLIDENE NANOPARTICLES, NANOPARTICLES OPTIONALLY CONTAINING ONE OR SEVERAL BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES		
(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES DE METHYLIDENE MALONATE, NANOPARTICULES CONTENANT EVENTUELLEMENT UNE OU PLUSIEURS MOLECULES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES		
(57) Abstract <p>The invention concerns a method for preparing nanoparticles formed of a statistic polymer of at least one compound of formula (I) in which A represents a group (a) or a group (b); R₁ and R₂, identical or different, represent a C₁-C₆ alkyl group linear or branched; n = 1, 2, 3, 4, or 5, characterised in that the monomer is previously made soluble in an organic aprotic solvent miscible in water forming with the polymerisation medium a mixture non-solvent of the formed polymer. The invention also concerns said nanoparticles, containing optionally one or several biologically active molecules, and the pharmaceutical compositions containing them.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{OR}_1 \\ \quad \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \quad \text{A} \end{array} \quad (I)$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} -\text{C}-\text{OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \quad (a)$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} -\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}-\text{OR}_2 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array} \quad (b)$ </div> </div>		
(57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules formées d'un polymère statistique d'au moins un composé de formule (I) dans laquelle A représente un groupe (a) ou un groupe (b), R₁ et R₂, identiques ou différents, représentent un groupe C₁-C₆ alkyle linéaire ou ramifié; n = 1, 2, 3, 4 ou 5, caractérisé en ce que le monomère est préalablement solubilisé dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau formant avec le milieu de polymérisation un mélange non solvant du polymère formé. L'invention concerne également lesdites nanoparticules, contenant éventuellement une ou plusieurs molécules biologiquement actives, et les compositions pharmaceutiques les contenant.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES DE METHYLIDENE MALONATE, NANOPARTICULES
CONTENANT EVENTUELLEMENT UNE OU PLUSIEURS MOLECULES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de préparation de
5 nanoparticules formées d'un composé méthylidène malonate polymérisé, lesdites
nanoparticules, contenant éventuellement une ou plusieurs molécules biologiquement
actives, ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant.

Par "nanoparticules", on entend des particules submicroniques ayant un
diamètre inférieur à environ 500 nanomètres. Des nanoparticules formées par
10 polymérisation en émulsion d'un cyanoacrylate d'alkyle sont décrites dans le brevet
EP 0 007 895. Le procédé utilisé dans la préparation de ces particules de
cyanoacrylate d'alkyle repose sur la polymérisation (anionique) du monomère qui a
lieu spontanément et en milieu aqueux. La préparation suivant le même principe
(polymérisation anionique en émulsion) de nanoparticules constituées d'un polymère
15 de méthylidène malonate est décrite notamment dans F. Lescure et al, Pharm. Res.,
1994, 11, 1270-1276. Ces monomères, dont la préparation est décrite dans le brevet
EP 0 283 364, ont une structure proche de celle des cyanoacrylates mais la fonction
nitrile de ces derniers est remplacée par un ester ou un ester d'ester. Comme les
cyanoacrylates, ils polymérisent à froid en milieu aqueux et peuvent être biodégradables.

20 Les nanoparticules de méthylidène malonate ainsi obtenues présentent
cependant certains désavantages.

En effet, la polymérisation en émulsion des méthylidènes malonates sous
forme de nanoparticules aboutit, en phase aqueuse et à pH légèrement acide, à la
formation d'oligomères, majoritairement de type trimère ou tétramère, hautement
25 biodégradables. Ces espèces moléculaires sont partiellement hydrosolubles, de sorte
que la dispersion de ces nanoparticules en milieu aqueux aboutit à leur solubilisation
et à la perte rapide de la structure particulaire (P. Breton et al., Eur. J. Pharm.
Biopharm., 1996, 42, 95-103). Lorsqu'une molécule biologiquement active est
associée aux nanoparticules de méthylidène malonate, elle est donc susceptible d'être
30 libérée très rapidement après l'administration, suite à l'effet de dilution dans le torrent

circulatoire qui entraîne la solubilisation rapide des oligomères formant la matrice particulaire, éventuellement avant d'arriver au site d'action du principe actif.

Certaines expériences ont montré que la polymérisation à pH basique permettait la formation de polymères de masses moléculaires plus élevées tout en conservant la taille des nanoparticules. Cependant, de telles synthèses se caractérisent par :

- l'impossibilité d'obtenir des polymères de $M_w < 10\,000$, et a fortiori de $M_w < 8000$, constitutifs de nanoparticules individualisées, sans formation d'agrégats et sans la présence importante d'espèces oligomériques,
- l'impossibilité de constituer à pH élevé ($pH > 7$) des polymères de $M_w > 20\,000$ et a fortiori de M_w supérieur, sans la formation inévitable d'agrégats rendant l'administration intravasculaire de ces préparations impossible.

On entend par M_w la masse moléculaire moyenne en masse (ou masse moléculaire moyenne) définie ainsi : $M_w = \sum n_i \cdot M_i^2 / \sum n_i \cdot M_i$ et par M_p la masse moléculaire de l'espèce quantitativement majoritaire.

Dans la suite de la description, la masse moléculaire est exprimée en équivalents polystyrènes (E_p).

Ce procédé de préparation ne convient donc pas si l'on désire préparer des nanoparticules de polyméthylidène malonate constituées de :

- polymères de masse moléculaire moyenne comprise entre environ 5000 et 10 000, notamment d'environ 8000,
- polymères de masse moléculaire moyenne supérieure à 20 000 sans formation d'agrégats.

La présente invention consiste donc à préparer des nanoparticules de méthylidène malonate ayant un diamètre inférieur à 500 nm, en particulier de 100 à 500 nm, formées d'espèces moléculaires homogènes de masses situées dans une large gamme (M_w compris entre environ 2 000 et 80 000). Le principe consiste à solubiliser le monomère dans une phase organique aprotique miscible à l'eau mais qui, dans les conditions de préparation des nanoparticules, forme avec le milieu aqueux de polymérisation un mélange non solvant du polymère formé.

Par "phase organique aprotique" ou "solvant organique aprotique", on entend une phase organique ou un solvant sans proton labile capable d'initier un anion.

Les avantages de ce procédé de préparation suivant l'invention sont nombreux :

- il permet une dispersion plus homogène du monomère dans le milieu de polymérisation.

- il utilise des solvants non chlorés et facilement éliminables car volatils,
- il évite la formation d'aggrégats de polymères,

- 10 – il donne lieu à des rendements de polymérisation élevés.

- il permet la constitution de polymères de masse moléculaires homogènes situées dans une large gamme (M_w d'environ 2000 à 100000, notamment d'environ 2000 à 80000) en formant des nanoparticules ayant un diamètre inférieur à 500 nm.

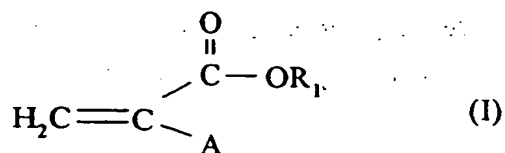
En outre, le procédé permet l'utilisation d'agents de dispersion tels que des agents tensioactifs non ioniques ou des polymères protecteurs de colloïdes, ce qui aboutit à l'obtention de particules ayant des propriétés de surface modulables.

Enfin, la masse moléculaire des oligomères/polymères formant les nanoparticules suivant l'invention peut être parfaitement maîtrisée en jouant sur les conditions suivantes de préparation :

- la concentration en monomère dans la phase organique,
- le pH et la molarité du milieu de polymérisation,
- la nature et la concentration de l'agent de dispersion,
- le rapport volumique phase aqueuse (milieu de polymérisation) /phase organique,

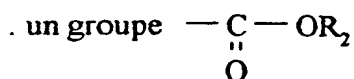
- 25 – le mode d'introduction du mélange organique dans la phase aqueuse.

L'invention concerne donc dans un 1er aspect un procédé de préparation de nanoparticules formées d'un polymère statistique d'au moins un composé de formule (I)

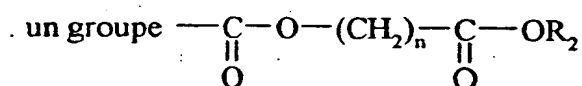


dans laquelle

- A représente



ou

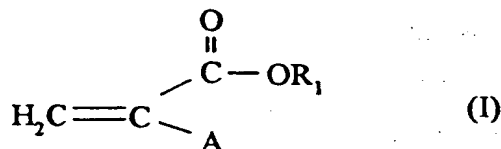


5 - R₁ et R₂, identiques ou différents, représentent un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

n = 1, 2, 3, 4 ou 5 ;

caractérisé en ce que le ou les monomère(s) est (sont), préalablement à la polymérisation, solubilisé(s) dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau
10 formant avec le milieu de polymérisation un mélange non solvant du polymère formé.

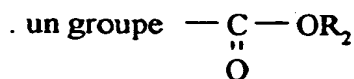
Dans un aspect avantageux, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules formées d'un polymère d'un composé de formule (I)



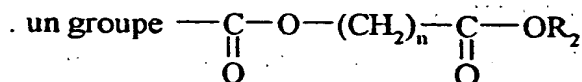
15

dans laquelle

- A représente



ou



20

- R₁ et R₂, identiques ou différents, représentent un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

n = 1, 2, 3, 4 ou 5 ;

caractérisé en ce que le monomère est, préalablement à la polymérisation, solubilisé dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau formant avec le milieu de polymérisation un mélange non solvant du polymère formé.

5 Selon un aspect particulier, le procédé selon l'invention permet la préparation de nanoparticules ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm, et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 1000 et 100000, notamment entre environ 1000 et 80000, en particulier entre environ 2000 et 80000, de préférence entre environ 8000 et 80000.

10 En particulier, le procédé selon l'invention comprend les étapes consistant à :

- préparer une solution d'au moins un composé de formule (I) dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau,

- ajouter, sous agitation, cette phase organique à un milieu de polymérisation aqueux à un pH compris entre 4,5 et 10,

15 - récupérer les nanoparticules ainsi obtenues après homogénéisation du mélange et évaporation sous vide du solvant organique.

On peut également ajouter le milieu de polymérisation aqueux à la phase organique contenant le monomère préalablement solubilisé et selon un autre aspect, le procédé selon l'invention comprend les étapes consistant à :

20 - préparer une solution d'au moins un composé de formule (I) dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau,

- ajouter, sous agitation, à cette phase organique un milieu de polymérisation aqueux à un pH compris entre 4,5 et 10,

25 - récupérer les nanoparticules ainsi obtenues après homogénéisation du mélange et évaporation sous vide du solvant organique.

Comme illustré plus loin dans les exemples, le pH du milieu de polymérisation est choisi en fonction de la masse moléculaire du polymère que l'on souhaite préparer.

30 Avantageusement, le mélange de la phase organique et du milieu aqueux est homogénéisé par agitation continue pendant environ 30 min, puis on complète éventuellement la préparation par de l'eau distillée.

Le polymère formé précipite dans le milieu de polymérisation et peut être récupéré par exemple par filtration. On peut ensuite conditionner et lyophiliser la suspension nanoparticulaire ainsi obtenue.

Le solvant organique aprotique utilisé pour disperser le ou les monomère(s) doit être un solvant dudit (desdits) monomère(s) qui soit également miscible à l'eau. Ce solvant est de préférence choisi parmi l'acétone, l'acétonitrile, le dioxanne et le tétrahydrofurane, l'acétone étant particulièrement préférée.

Des aspects préférés du procédé sont les suivants :

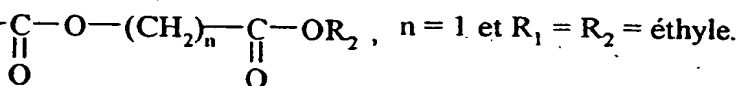
- la concentration en monomère(s) de formule (I) dans le solvant organique est de l'ordre de 30 mg/ml à 150 mg/ml ;
- la molarité du milieu de polymérisation est de l'ordre de 1/30 M à 1/3 M;
- le rapport volumique phase aqueuse / phase organique est compris entre 3/1 et 20/1, de préférence entre 3/1 et 15/1.

Avantageusement, le milieu de polymérisation contient un ou plusieurs agents tensioactifs ou protecteurs de colloïdes.

Les agents tensioactifs peuvent par exemple être des tensioactifs ioniques ou non ioniques. On utilisera de préférence des agents tensioactifs non ioniques choisis parmi les copolymères de polyoxyéthylène, de polyoxypropylène, les poloxamers et les polysorbates. En tant qu'agents protecteurs de colloïdes, on utilisera de préférence les dérivés polysaccharidiques tels que les dextrans, les dérivés cellulotiques hydrosolubles ; les polyéthylène glycols ; l'alcool polyvinylique.

De préférence, le composé polymérisé pour former les nanoparticules selon le procédé de l'invention est un composé de formule (I) dans laquelle : A représente un groupe

25



Dans un autre aspect préféré, le composé polymérisé pour former les nanoparticules selon le procédé de l'invention est un composé de formule (I) dans laquelle : A représente un groupe



Avantageusement, on peut également polymériser de manière aléatoire un mélange de composés de formule (I) dans laquelle A est un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ ou un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ tels que définis plus haut.

Dans un 2ème aspect, l'invention concerne des nanoparticules formées d'un polymère statistique d'au moins un composé méthylidène malonate de formule (I),
 5 ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 1000 et 100000, notamment entre 1000 et 80000, en particulier entre environ 2000 et 80000, de préférence comprise entre environ 8000 et 80000, susceptibles d'être obtenues par ce procédé.

10 En particulier, lesdites nanoparticules susceptibles d'être obtenues par ce procédé sont formées d'un polymère d'un composé de formule (I), ont un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et un Mw compris entre environ 1000 et 80000, en particulier entre environ 2000 et 80000, de préférence comprise entre environ 8000 et 80000.

15 Dans un aspect préféré, l'invention concerne des nanoparticules formées d'un polymère statistique d'au moins un composé de formule (I), ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 8000 et 100000, de préférence entre environ 8000 et 80000.

20 L'invention concerne en particulier des nanoparticules formées d'un polymère d'un composé de formule (I), ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 8000 et 80000.

Avantageusement, lesdites nanoparticules sont formées d'un composé de formule (I) dans laquelle : A représente un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$,
 25 $n = 1$ et $R_1 = R_2 = \text{éthyle}$.

Dans un autre aspect préféré, lesdites nanoparticules sont formées d'un composé de formule (I) dans laquelle A représente un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ et $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{propyle}$.

Avantageusement, lesdites nanoparticules peuvent être constituées d'un polymère statistique d'un mélange de composés de formule (I) dans laquelle A est un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ ou un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ tels que définis plus haut.

Selon un aspect ultérieur de l'invention, lesdites nanoparticules comprennent dans leur réseau polymérique une ou plusieurs molécules biologiquement actives telles que mentionnées plus haut.

En effet, dans un aspect avantageux du procédé selon l'invention, la phase organique (lorsqu'il s'agit d'une molécule biologiquement active insoluble dans l'eau) ou le milieu de polymérisation peut contenir une ou plusieurs molécules biologiquement actives.

Par "molécule biologiquement active", on entend de manière non limitative toute molécule ou macromolécule ayant une activité biologique prophylactique ou curative, in vitro ou in vivo, notamment un agent anti-infectieux, en particulier un agent antiseptique, antibiotique, antiviral, antiparasitaire ou antimitotique, notamment anticancéreux.

Des agents antibiotiques ou antiseptiques utilisables peuvent être par exemple la rifampicine et la colistine.

A titre d'exemples d'agents antiviraux, on peut citer de manière non limitative la didanosine, la ribavirine, la zidovudine, l'acyclovir, le ganciclovir, le foscarnet, la vidarabine et la zalcitabine.

Le cis-platine, le 5-fluorouracile ou le taxol peuvent par exemple être utilisés en tant qu'agents anticancéreux. Un autre agent antitumoral avantageux est la créatine phosphate dont l'activité est décrite dans la demande EP 0 614 366.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant lesdites nanoparticules comprenant une ou plusieurs molécules biologiquement actives, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions selon l'invention peuvent être des compositions administrables par exemple par voie orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, locale, rectale, pulmonaire ou nasale.

Les formes d'administration appropriées comprennent notamment les formes par voie orale telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, ainsi que les formes d'administration sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intranasale ou intraoculaire et les formes d'administration rectale.

L'invention est illustrée par les exemples ci-dessous, dans laquelle la préparation des particules est effectuée à température ambiante (environ 21°C). La taille, ou diamètre, des nanoparticules a été mesuré avec un compteur à diffusion d'un rayon laser (Coulter Electronic Inc., USA). La masse moléculaire des polymères a été déterminée par chromatographie en perméation de gel.

Exemple 1 :

500 mg de monomère 1-éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonylméthylène-oxycarbonyléthène (Laboratoires UPSA /CARPIBEM, France) préalablement désorbés du SO₂ pendant 3 h sous 25 mbars sont dissous dans 5,55 ml d'acétone. Cette solution est ensuite mélangée progressivement et sous agitation magnétique avec 50 ml d'un milieu aqueux tamponné à pH 8 (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 1/15 M) et contenant 500 mg de dextran 70 (FLUKA CHEMIE, Suisse). La polymérisation quasi-instantanée produit une opacification du mélange qui présente un effet Tyndall caractéristique des solutions colloïdales. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes après l'introduction complète de la phase organique. Ensuite, 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g de glucose ou de tréhalose (protecteurs de colloïdes et cryoprotecteurs) sont ajoutés à la suspension nanoparticulaire et le mélange est soumis à une évaporation sous vide afin d'éliminer l'acétone et de réduire le volume de la suspension aqueuse à 50 ml. Après filtration sur filtre papier (diamètre des pores 5 à 15 µm), la préparation est lyophilisée. Mesurées par diffusion d'un rayon laser, les particules contenues dans le filtrat ont un diamètre de 288 nm. La masse moléculaire moyenne (Mw) du méthylidène malonate constituant la matrice polymère des particules est évaluée à 67 000 par chromatographie en perméation de gel.

Exemple 2 : Etude de la variation du pH

On procède suivant la technique décrite dans l'exemple 1, mais en faisant uniquement varier le pH du tampon phosphate. Les résultats sont rapportés dans le tableau 1 ci-dessous, dans lequel Mp est la masse moléculaire de l'espèce principale et Mw est la masse moléculaire moyenne du polymère.

Tableau 1

	pH du milieu de polymérisation							
	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
taille (nm)	280	344	424	423	361	382	313	288
écart-type +/-nm	9	9	7	6	9	7	2	3
caractéristiques du polymère (Ep)								
Mp	662	655	655	19700	31500	36900	40300	59300
Mw	2080	4740	11140	17600	28900	39000	53200	67200

Les résultats montrent que la masse moléculaire moyenne des polymères constituant les nanoparticules augmente régulièrement avec le pH du milieu de polymérisation.

Le profil de chromatographie en perméation de gel de la Figure 1 représente la distribution de masse moléculaire du polymère préparé à pH 5,5 (concentration : 90 mg/ml). On observe en 1 un large pic correspondant aux espèces de haute masse moléculaire moyenne (Mw) et en 2 un pic étroit correspondant aux oligomères minoritaires (trimères et tétramères majoritaires).

Les lignes en pointillés délimitent la portion analysable du chromatogramme. Le pic F est celui du toluène utilisé comme étalon interne et le pic négatif correspond aux traces d'eau.

Exemple 3 : Etude de la variation de la concentration du monomère.

On procède suivant la technique décrite dans l'exemple 1, mais en faisant uniquement varier la concentration du monomère dans l'acétone. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2

		concentration en monomère dans la phase organique (mg/ml)		
		30	60	90
taille (nm)		213	239	288
écart-type +/-nm		2	4	3
		caractéristiques du polymère (Ep)		
Mp		31500	39600	59300
Mw		44700	63000	67200

Les résultats montrent que la masse moléculaire de l'espèce principale (Mp), de même que la masse moléculaire moyenne (Mw) des polymères constituant les nanoparticules augmentent régulièrement avec la concentration en monomère dans la phase organique.

Exemple 4 :

On procède selon les exemples 1 à 3 mais en remplaçant le dextran 70 protecteur de colloïdes par un tensioactif non ionique, le Pluronic F68 (BASF Corporation, USA).

Les résultats sont rapportés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

		pH du milieu de polymérisation contenant 0,5 % de Pluronic F.68							
		4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Taille (nm)		87	80	95	117	122	121	146	153
écart-type +/-nm		1	2	2	5	9	1	3	1
		caractéristiques du polymère (Ep) *							
Mp		656	13300	14800	25600	38600	43700	45300	77800
Mw		5520	9740	12300	23600	33000	51600	70900	88900

* concentration en monomère dans l'acétone = 90 mg/ml.

Les résultats montrent, pour des mêmes conditions de pH :

- une augmentation de la masse moléculaire de l'espèce principale (Mp) et de la masse moléculaire moyenne (Mw) des polymères constituant les nanoparticules en présence du tensioactif par rapport au protecteur de colloïdes,
- 5 – une diminution de la taille de ces mêmes nanoparticules en présence du tensioactif par rapport au protecteur de colloïdes.

Exemple 5 : Etude de la molarité du milieu de polymérisation

- 10 Selon le procédé décrit dans l'exemple 1, on introduit 500 mg de monomère dissous dans 16,6 ml d'acétone, dans un tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) de molarité croissante, et contenant par ailleurs 0,5 % de Pluronic F68.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4

molarité	taille des nanoparticules (nm)	écart-type (nm)	Mp (Ep)	Mw (Ep)
0,033 M	127	2	15200	12500
0,066 M	123	1	14600	12400
0,133 M	124	1	653	9790
0,267 M	179	3	660	8690

- 15 Les résultats montrent une diminution de la masse moléculaire moyenne (Mw) des polymères constituant les nanoparticules proportionnellement à une augmentation de la molarité du milieu.

Exemple 6 :

- 20 Des nanoparticules sont préparées suivant les exemples 1 à 3 et comparées à des nanoparticules préparées selon le procédé décrit par Lescure et al., Pharm. Res. 1994, 11, 1270 – 1276. Pour cela, on introduit 100 mg de monomère sous agitation dans 10 ml d'un milieu tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1/15 M) de pH 5 à 8.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 5 ci-dessous dans lequel les oligomères sont définis comme toute espèce moléculaire de masse moléculaire inférieure ou égale à environ 920.

Tableau 5

		pH du milieu de polymérisation contenant 1 % de dextran 70					
		5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Procédé selon Lescure et al., 1994	taille (nm)	260	296	337	335	271	322
	écart-type +/-nm	5	5	10	4	6	6
	Mp	666	660	675	685	15572	13000
	Mw	1719	2421	5335	6041*	6759*	7594*
	% oligomères	43	53	27	38	18	13
	rendement d'obtention des nanoparticules % + 5	87	79,5	71,5	59,5	21	23
Procédé selon l'invention **	taille (nm)	424	423	361	382	313	288
	écart-type +/-nm	7	6	9	7	2	3
	Mp	655	19695	31508	36290	40278	59300
	Mw	11138	17569	28918	38997	53181	67201
	% oligomères	19	14	8	4	3	2
	rendement d'obtention des nanoparticules % + 5	82,5	73	84,5	91	85	86,5

5 * présence d'agrégats

** concentration en monomère dans l'acétone = 90 mg/ml

Les résultats montrent que, pour toute condition expérimentale de pH identique :

– la masse moléculaire moyenne (M_w) des polymères constituant les nanoparticules fabriquées selon Lescure et al. est inférieure à celle du polymère obtenu selon le procédé de l'invention;

5 – les taux d'oligomères (trimères–tétramères) constitutifs des polymères sont significativement inférieurs pour les nanoparticules préparées selon le procédé de l'invention;

10 – les rendements de polymérisation sous forme de nanoparticules sont supérieurs pour le procédé de l'invention par rapport au procédé selon Lescure et al (la formation d'agréats se traduit par de faibles rendements à pH basique pour le procédé selon Lescure et al).

15 Le profil de chromatographie en perméation de gel de la Figure 2 représente les distributions de masse moléculaire des polymères préparés à pH 7,5 selon le procédé de l'invention d'une part (tracé A), et selon le procédé de Lescure et al d'autre part (tracé B). Mis à part le pic 3 correspondant au toluène, on observe pour le tracé A un pic 1 unique correspondant à l'espèce principale ($M_p=40278$) alors que pour le tracé B, on observe également la présence d'un pic 2 significatif correspondant aux oligomères (trimères et tétramères).

Exemple 7 :

20 50 ml d'un milieu aqueux tamponné à pH 5 ; 6,5 ou 8 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1/15 M) et contenant 0,5 % de Pluronic F68 (BASF Corporation, USA) sont ajoutés progressivement et sous agitation magnétique à 5,55 ml d'une solution de 500 mg de monomère 1-éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonyl méthylèneoxycarbonyléthène (LABORATOIRES UPSA/CARPIBEM, France)

25 préalablement désorbés du SO_2 pendant 3 h sous 25 mbars dans 5,55 ml d'acétone. L'agitation est maintenue pendant 16 h pour les essais à pH 5 et 6,5 ou pendant 30 minutes pour l'essai à pH 8 après l'introduction complète de la phase organique. Ensuite, 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g de glucose ou de tréhalose (protecteurs de colloïdes et cryoprotecteurs) sont ajoutés à la suspension nanoparticulaire et le

30 mélange est soumis à une évaporation sous vide afin d'éliminer l'acétone et de réduire le volume de la suspension aqueuse à 50 ml. Après filtration sur filtre en papier

(diamètre des pores 5 à 15 μm), la préparation est lyophilisée. Le diamètre des particules contenues dans le filtrat est mesuré par diffusion d'un rayon laser. La masse moléculaire moyenne (M_w) du méthylidène malonate constituant la matrice polymère des particules est évaluée par chromatographie en perméation de gel.

- 5 Les résultats sont rapportés dans le tableau 6 ci-dessous, dans lequel M_p est la masse moléculaire de l'espèce principale et M_w est la masse moléculaire moyenne du polymère.

Le rendement est déterminé par le rapport entre la quantité de monomère introduit dans le milieu réactionnel et la quantité de polymère constituant les

10 nanoparticules.

Tableau 6

	pH du milieu de polymérisation		
	5,0	6,5	8,0
taille (nm)	848	394	754
écart-type +/-nm	36	32	34
	caractéristiques du polymère (E_p)		
M_p	312	24300	26500
M_w	6450	20100	20100
	rendement		
%	59	57	30
écart-type	5,1	4,6	4,2

Exemple 8 : Utilisation de différents solvants.

- On procède suivant le procédé de l'exemple 1, mais en utilisant l'acétone,
- 15 l'acétonitrile ou le tétrahydrofuranne (THF) comme solvant du monomère.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7

Solvant	Granulométrie moyenne (nm)	rendement (%)	Mw
Acétone	253	74	54 100
Acétonitrile	197	69	31 700
THF	191	70	30 300

Exemple 9 : Etude du rapport volumique eau / solvant

On procède suivant le procédé de l'exemple 1, mais en faisant varier le rapport volumique eau / acétone.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8

	Rapport volumique eau / solvant		
	4,5 / 1	9 / 1	18 / 1
taille (nm)	241	288	334
rendement (%)	74	74	85
	caractéristiques du polymère		
Mp	62100	59300	33100
Mw	42000	67200	24600

Exemple 10 : Mise en oeuvre du procédé à pH 10.

Les essais ont été réalisés dans un milieu aqueux à pH = 10 en présence soit d'agent tensio-actif soit de colloïde protecteur et ce, soit selon le procédé de l'exemple 1, soit selon le procédé de l'exemple 7.

1) essai 1

100 mg de monomère 1-éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonylméthylène-oxycarbonyléthène sont dissous dans 1 ml d'acétone.

Cette solution est ensuite ajoutée progressivement, et sous agitation magnétique, dans 10 ml d'un milieu aqueux à pH = 10 et contenant 100 mg de Dextran 70.

La polymérisation est instantanée. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes après introduction de la totalité de la phase organique. Ensuite, 10 ml d'eau

distillée sont additionnés à la suspension nanoparticules, et le mélange est soumis à une évaporation sous vide afin d'éliminer l'acétone. Puis le milieu est centrifugé ($v = 10\,000$ tr/min, 10 min à 4°C).

2) essai 2

5 Le protocole expérimental est identique à celui de l'essai 1 mais en remplaçant le Dextran 70 par du Pluronic F68.

3) essai 3

10 10 ml d'un milieu aqueux à pH = 10 contenant 100 mg de Dextran 70 sont ajoutés progressivement et sous agitation magnétique dans une phase organique constituée de 100 mg de monomère et de 1 ml d'acétone. La polymérisation est instantanée. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes après introduction de la totalité de la phase aqueuse. Ensuite, 10 ml d'eau distillée sont additionnés à la suspension nanoparticulaire et le mélange est soumis à une évaporation sous vide afin d'éliminer l'acétone. Puis le milieu est centrifugé ($v = 10\,000$ tr/min, 10 min à 4°C).

15 4) essai 4

Le protocole expérimental est identique à celui de l'essai 3 mais en remplaçant le Dextran 70 par du Pluronic F68. Après centrifugation, les nanoparticules contenues dans le culot sont analysées par en chromatographie d'exclusion stérique pour déterminer leur masse moléculaire moyenne en poids (Mw).

20 Les résultats sont rapportés dans le tableau 9 ci-après :

Tableau 9

	Mw	Granulométrie (nm)
Essai 1	8 800	240
Essai 2	6 900	245
Essai 3	1 400	316
Essai 4	1 850	333

Exemple 11 :

25 On procède suivant la technique de polymérisation décrite dans l'exemple 1, mais en utilisant du 1,1-propoxycarbonyléthène (Laboratoires UPSA/CARPIBEM, France) ci-après dénommé MM 3.3, seul ou en mélange avec du monomère 1-

éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonylméthylèneoxy-carbonyléthène (Laboratoires UPSA / CARPIBEM, France), ci-après dénommé MM 2.1.2. Les résultats sont rapportés dans le tableau 10 ci-dessous, dans lequel Mp est la masse moléculaire de l'espèce principale et Mw est la masse moléculaire moyenne du polymère.

5

Tableau 10

	Rapport MM 3.3/MM 2.1.2			
	100/0	75/25	50/50	25/75
Taille	123	223	298	155
Rendement (%)	77	73	80	78
	Caractéristiques du polymère			
Mp	44764	92090	37467	21727
Mw	44122	89793	37467	21727

Exemple 12 : Préparation de nanoparticules contenant de la rifampicine

5 mg de rifampicine base (Sigma) sont dissous dans 1 ml d'acétone auquel on ajoute 90 mg de monomère 1-éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonylméthylèneoxy-carbonyléthène (LABORATOIRES UPSA /CARPIBEM, France) préalablement désorbé du SO₂ pendant 3 h sous 25 mbars. A l'aide d'une pipette en verre, cette solution est ensuite ajoutée progressivement et sous agitation constante (750 rpm) à 9 ml de milieu aqueux tamponné à pH 6,0 à l'aide d'un tampon phosphate (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,066M) et contenant 90 mg de dextran 70 (1% p/v). Après 18 h de polymérisation à 20°C, 9 ml d'eau distillée contenant 5% de D-glucose sont additionnés sous agitation à la suspension nanoparticulaire, puis le mélange est soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un Rotavapor (20°C, 25 mbars) afin d'éliminer l'acétone et de réduire le volume de la suspension aqueuse à 9 ml. La préparation est ensuite lyophilisée; la congélation a lieu à -30°C et la sublimation à +20°C pendant 36 h à une pression de 0,05 mbar.

La taille des nanoparticules et la concentration en rifampicine sont mesurés avant et après lyophilisation. La taille est mesurée par diffusion d'un rayon laser. Le dosage de la rifampicine est réalisé par chromatographie liquide haute performance

couplée à un spectrophotomètre. La phase mobile est composée d'un mélange méthanol/acétate d'ammonium 0,05M (65:35), le pH est ajusté à 7,3, le débit est fixé à 1ml/min et l'absorption est lue à 254 nm. Le taux de rifampicine non liée aux nanoparticules est mesuré dans le surnageant obtenu après ultracentrifugation de la suspension nanoparticulaire (80000g, 1 h à 4°C). La quantité de rifampicine fixée aux nanoparticules correspond à la fraction présente dans le culot, qui est dissous dans le THF avant de procéder au dosage direct de la rifampicine.

On obtient les résultats suivants :

- taille des nanoparticules contenant de la rifampicine : 266 ± 63 nm avant lyophilisation et 282 ± 54 nm après lyophilisation;
- pourcentage de fixation de la rifampicine : $8,5 \pm 0,5\%$ avant et après lyophilisation.

Exemple 13 : Préparation de nanoparticules contenant de la colistine

On procède de la même manière que dans l'exemple 12, mais le principe actif étant hydrosoluble, celui-ci est incorporé dans le milieu de polymérisation à une concentration de 0,5 mg/ml avant addition de la phase organique.

La taille des nanoparticules contenant de la colistine mesurée par diffusion d'un rayon laser est de 282 ± 65 nm après évaporation et de 283 ± 26 nm après conservation à +4°C pendant 4 jours. Dosée selon la technique de diffusion sur gélose (S.P. Gotoff et al., Antimicrob. Agents Chemother, 1962, 107-113), la colistine est retrouvée à la concentration de 15 µg/ml dans le surnageant obtenu après ultracentrifugation de la suspension nanoparticulaire (80000g, 1 h à 4°C) : la fraction non liée aux nanoparticules est donc évaluée à 3% de la quantité totale de colistine ajoutée.

Exemple 14 :

Préparation de nanoparticules contenant de l'azido-thymidine (AZT) (Sigma Aldrich Chimie, France).

240 mg de monomère 1-éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonylméthylène-oxycarbonyléthène (Laboratoires UPSA / CARPIBEM, France) préalablement désorbé du SO₂ pendant 3 heures sous 25 mbars, sont dissous dans 2,5 ml d'acétone. A

l'aide d'une propipette, cette solution est ensuite ajoutée progressivement et sous agitation constante à 22,5 ml de milieu aqueux tamponné à pH 8,0 à l'aide d'un tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,066M) et contenant 225 mg de dextran 70 (1 % p/v), ainsi que le principe actif hydrosoluble à une concentration de 0,53 mg/ml.

- 5 Après 18 heures de polymérisation à 20°C, 22,5 ml d'eau déminéralisée contenant 5 % de D-glucose sont additionnés sous agitation à la suspension nanoparticulaire, puis le mélange est soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un Rotavapor (20°C, 25 mbars) afin d'éliminer l'acétone et de réduire le volume de la suspension aqueuse à 39,0 ml. La préparation est ensuite lyophilisée ; la congélation a lieu à -30°C et la
- 10 sublimation à +20°C pendant 36 heures à une pression de 0,05 mbar.

- La taille des nanoparticules contenant de l'AZT mesurée par diffusion d'un rayon laser est de 255 ± 63 nm avant lyophilisation. Le taux d'AZT dans le surnageant après centrifugation de la suspension nanoparticulaire (12 000 tr/min, 1 h à 4°C) est dosé par spectrophotométrie UV à 266 nm. On obtient une concentration de $98 \mu\text{g/ml}$:
- 15 la fraction non liée aux nanoparticules est donc évaluée à 31,9 % de la quantité totale d'AZT ajouté. La fraction d'AZT liée aux nanoparticules est donc de 68,1 %.

Exemple 15 : Préparation de nanoparticules contenant de la créatine phosphate (Boehringer Mannheim).

- 20 L'encapsulation de la créatine phosphate est réalisée selon la technique de l'exemple 14. La taille des nanoparticules contenant de la créatine phosphate mesurée par diffusion d'un rayon laser est de 275 ± 260 nm avant lyophilisation. Le dosage de la créatine phosphate est réalisé par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectrophotomètre. La phase mobile est composée d'un tampon
- 25 phosphate (KH_2PO_4 , 0,05M) ajusté à pH 3,3. Le débit est fixé à 2 ml/min et l'absorption est lue à 200 nm.

- Le taux de créatine phosphate non liée aux nanoparticules est mesuré dans le surnageant obtenu après centrifugation de la suspension nanoparticulaire (12 000 tr/min, 1 h à 4°C). La créatine phosphate est retrouvée à une concentration de
- 30 $463 \mu\text{g/ml}$ dans le surnageant : la fraction non liée aux nanoparticules est donc

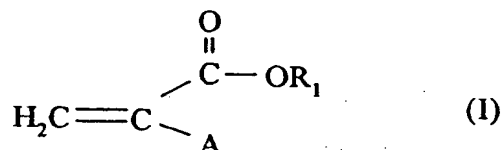
évaluée à 81 % de la quantité totale de créatine phosphate ajoutée. La fraction de créatine phosphate liée aux nanoparticules est donc de 19 %.

Exemple 16 : Préparation de nanoparticules contenant du 5-fluorouracile (5-FU)

- 5 L'encapsulation du 5-FU (Sigma Aldrich Chimie, France) est réalisée selon la technique de l'exemple 14. La taille des nanoparticules contenant le 5-FU mesurée par diffusion d'un rayon laser est de 516 ± 88 nm avant lyophilisation. Dosé par spectrophotométrie UV à 266 nm, le 5-FU est retrouvé à une concentration de 70 $\mu\text{g/ml}$ dans le surnageant obtenu après centrifugation de la suspension
- 10 nanoparticulaire (12 000 tr/min, 1 h à 4°C) : la fraction non liée aux nanoparticules est donc évaluée à 23,3 % de la quantité totale de 5-FU ajouté. La fraction de 5-FU liée aux nanoparticules est donc de 76,7 %.

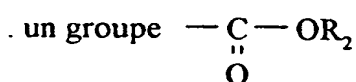
REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de nanoparticules formées d'un polymère statistique
5 d'au moins un composé de formule (I)

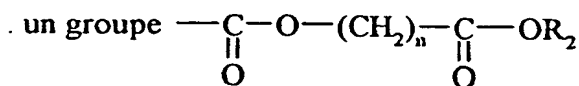


dans laquelle

– A représente



10 ou

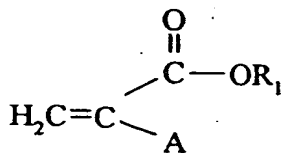


– R₁ et R₂, identiques ou différents, représentent un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

n = 1, 2, 3, 4 ou 5 ;

- 15 caractérisé en ce que le ou les monomère(s) est (sont), préalablement à la polymérisation, solubilisé(s) dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau formant avec le milieu de polymérisation un mélange non solvant du polymère formé.

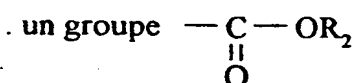
2. Procédé selon la revendication 1 de préparation de nanoparticules formées d'un polymère d'un composé de formule (I)



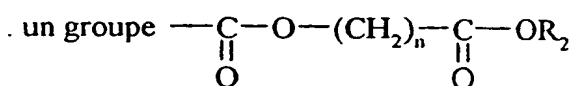
20

dans laquelle

– A représente



ou



– R₁ et R₂, identiques ou différents, représente un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

5 – n = 1, 2, 3, 4 ou 5,

caractérisé en ce que le monomère est, préalablement à la polymérisation, solubilisé dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau formant avec le milieu de polymérisation un mélange non solvant du polymère formé.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, pour la préparation de
10 nanoparticules ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm, et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 1000 et 100000, notamment entre environ 1000 et 80000, en particulier entre environ 2000 et 80000, de préférence entre environ 8000 et 80000.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce
15 qu'il comprend les étapes consistant à :

– préparer une solution d'au moins un composé de formule (I) dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau,

– ajouter, sous agitation, à cette phase organique un milieu de polymérisation aqueux à un pH compris entre 4,5 et 10,

20 – récupérer les nanoparticules ainsi obtenues après homogénéisation du mélange et évaporation sous vide du solvant organique.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

25 – préparer une solution d'au moins un composé de formule (I) dans un solvant organique aprotique miscible à l'eau,

– ajouter, sous agitation, à cette phase organique un milieu de polymérisation aqueux à un pH compris entre 4,5 et 10,

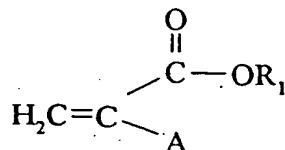
– récupérer les nanoparticules ainsi obtenues après homogénéisation du mélange et évaporation sous vide du solvant organique.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le solvant organique aprotique est choisi parmi l'acétone, l'acétonitrile, le dioxanne et le tétrahydrofurane.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la concentration en composé(s) de formule (I) dans le solvant organique est de l'ordre de 30 mg/ml à 150 mg/ml.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la molarité du milieu de polymérisation est de l'ordre de 1/30 M à 1/3 M.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le milieu de polymérisation contient un ou plusieurs agents tensioactifs ou protecteurs de colloïdes.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les agents tensioactifs sont des tensioactifs non ioniques choisis parmi les copolymères de polyoxyéthylène, de polyoxypropylène, les poloxamers et les polysorbates.
11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que les agents protecteurs de colloïdes sont choisis parmi les dextrans, les dérivés cellulosiques hydrosolubles, les polyéthylène glycols et l'alcool polyvinylique.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la phase organique ou le milieu de polymérisation contient une ou plusieurs molécules biologiquement actives.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le composé polymérisé est un composé de formule (I) dans laquelle A représente un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$, $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{éthyle}$ et $n = 1$.
14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le composé polymérisé est un composé de formule (I) dans laquelle A représente un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ et $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{propyle}$.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'on polymérise de manière aléatoire un mélange de composés de formule (I) dans

laquelle A est un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$ ou un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$

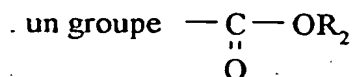
tels que définis dans la revendication 1.

16. Nanoparticules formées d'un polymère statistique d'au moins un composé méthylidène malonate de formule (I)

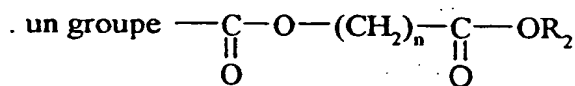


dans laquelle

– A représente



ou

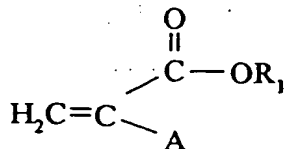


– R₁ et R₂, identiques ou différents, représente un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

– n = 1, 2, 3, 4 ou 5,

ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 1000 et 100000, notamment entre 1000 et 80000, en particulier entre environ 2 000 et 80 000, de préférence entre environ 8000 et 80000, susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

17. Nanoparticules formées d'un polymère d'un composé méthylidène malonate de formule (I)



dans laquelle

– A représente

un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$

ou

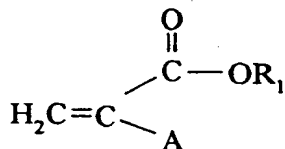
un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$

– R₁ et R₂, identiques ou différents, représente un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

– n = 1, 2, 3, 4 ou 5,

ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 1000 et 80000, en particulier entre environ 2 000 et 80 000, de préférence entre environ 8000 et 80000, susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

18. Nanoparticules formées d'un polymère statistique d'au moins un composé de formule (I)



15 dans laquelle

– A représente

un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$

ou

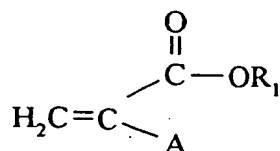
un groupe $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—O—(CH}_2\text{)}_n\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{—OR}_2$

20 – R₁ et R₂, identiques ou différents, représente un groupe C₁–C₆ alkyle linéaire ou ramifié ;

– n = 1, 2, 3, 4 ou 5,

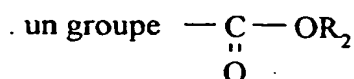
ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 8 000 et 100000, de préférence entre environ 8000 et 80000.

19. Nanoparticules formées d'un polymère d'un composé de formule (I)

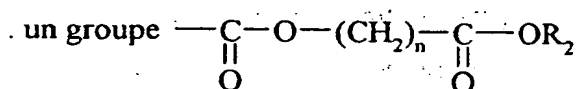


dans laquelle

- A représente



ou

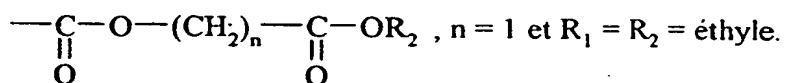


- R_1 et R_2 , identiques ou différents, représente un groupe $\text{C}_1\text{--C}_6$ alkyle linéaire ou ramifié ;

- 10 - $n = 1, 2, 3, 4$ ou 5 ,

ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 100 et 500 nm et une masse moléculaire moyenne (Mw) comprise entre environ 8000 et 80000.

20. Nanoparticules selon l'une des revendications 18 ou 19, formées d'un polymère d'un composé de formule (I) dans laquelle A est un groupe



- 15 21. Nanoparticules selon l'une des revendications 18 ou 19, formées d'un polymère d'un composé de formule (I) dans laquelle A est un groupe $\begin{array}{c} \text{---C---OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$, et $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{propyle}$.

22. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 16 à 21, caractérisées en ce qu'elles comprennent une ou plusieurs molécules biologiquement actives.

23. Composition pharmaceutique contenant à titre de principe actif des nanoparticules selon la revendication 22 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

1/2

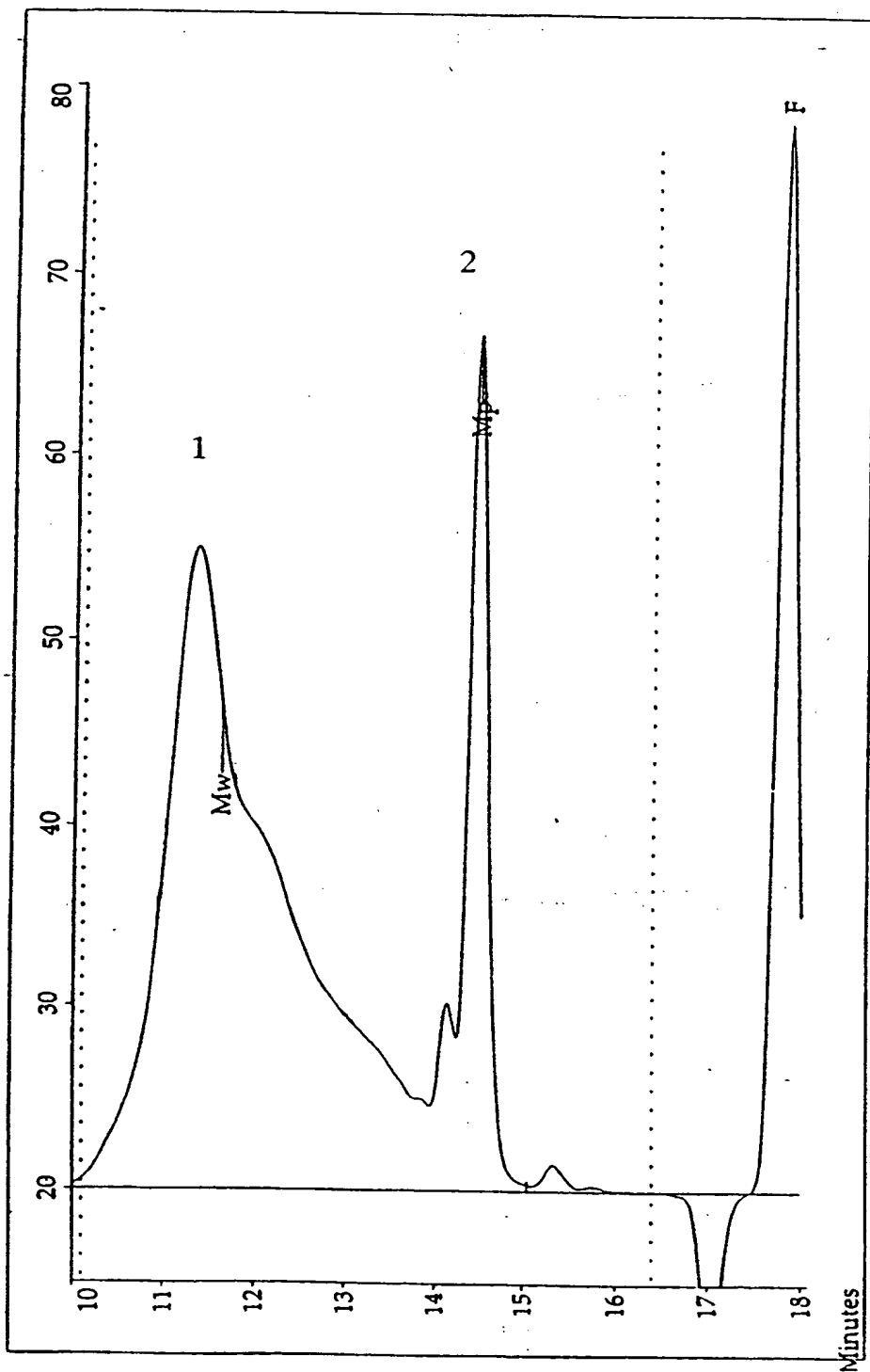


FIG.1

2/2

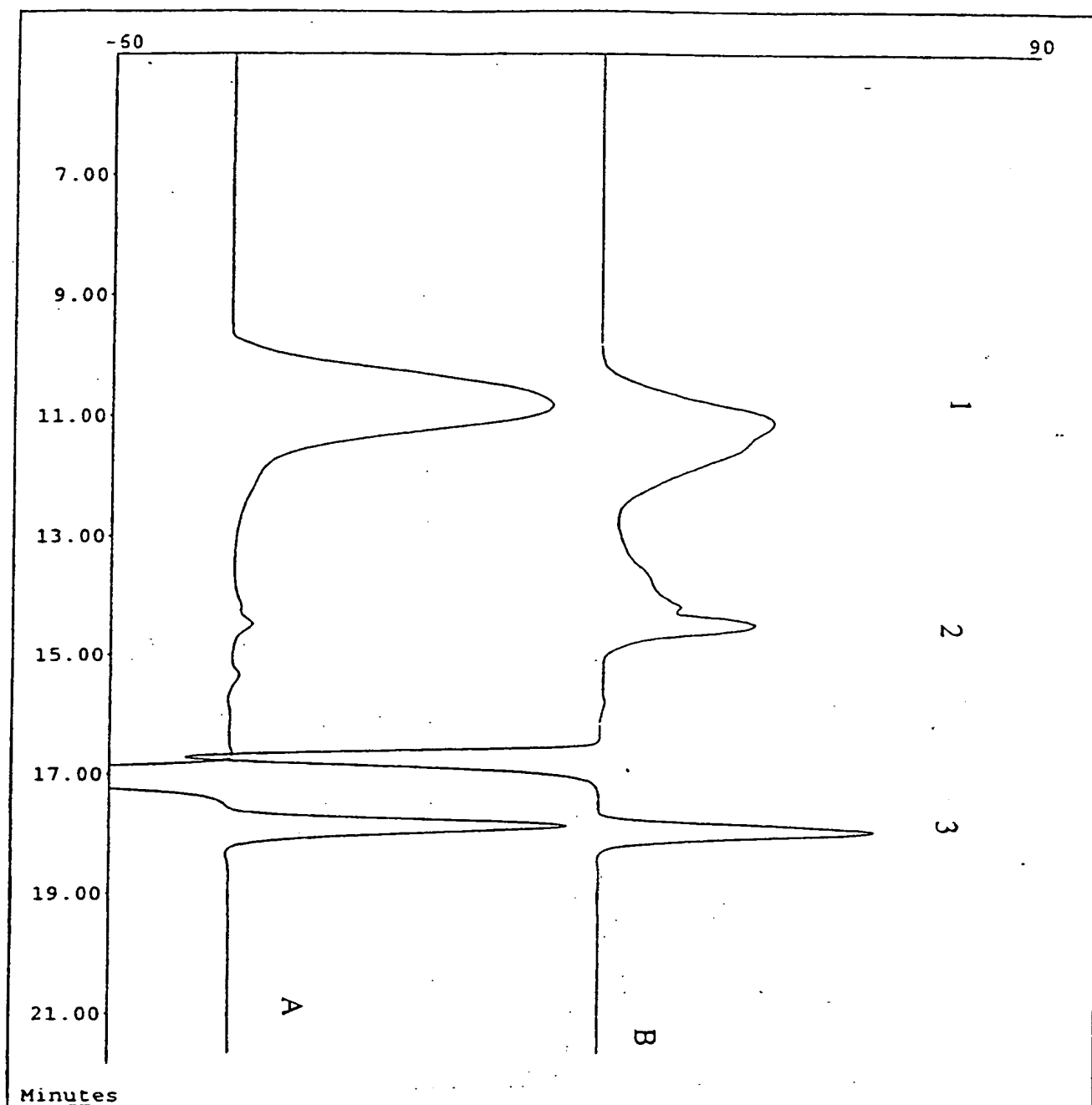


FIG.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. ational Application No

PCT/FR 97/01907

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K9/51 C08F22/14 C08F22/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

A	WO 96 02278 A (UNION PHARMA SCIENT APPL ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); BRU MAGNIE) 1 February 1996 see example 1	1,2
---	--	-----

A	EP 0 007 895 A (COUVREUR PATRICK ; ROLAND MICHEL (BE); SPEISER PETER (CH)) 6 February 1980 cited in the application	1,2
---	--	-----

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 1998

Date of mailing of the international search report

23/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goovaerts, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01907

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9602278 A	01-02-96	FR 2722411 A	19-01-96
		AU 3079895 A	16-02-96
EP 0007895 A	06-02-80	BE 869107 A	19-01-79
		AT 370427 B	25-03-83
		CA 1132069 A	21-09-82
		US 4329332 A	11-05-82
		US 4489055 A	18-12-84

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

L ande Internationale No

PCT/FR 97/01907

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K9/51 C08F22/14 C08F22/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C08F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 02278 A (UNION PHARMA SCIENT APPL ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); BRU MAGNIE) 1 février 1996 voir exemple 1	1,2
A	EP 0 007 895 A (COUVREUR PATRICK ; ROLAND MICHEL (BE); SPEISER PETER (CH)) 6 février 1980 cité dans la demande	1,2

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 mars 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/03/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Goovaerts, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

nde Internationale No

PCT/FR 97/01907

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9602278 A	01-02-96	FR 2722411 A	19-01-96
		AU 3079895 A	16-02-96
EP 0007895 A	06-02-80	BE 869107 A	19-01-79
		AT 370427 B	25-03-83
		CA 1132069 A	21-09-82
		US 4329332 A	11-05-82
		US 4489055 A	18-12-84

THIS PAGE BLANK (USPTO)